

**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
EKSTRAK ETANOL DAUN KACA PIRING (*Gardenia
augusta* Merr.) TERHADAP *Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh:.

SITI NUR AZIZAH HASYIM

NIM 152210101127

**BAGIAN BIOLOGI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2019



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
EKSTRAK ETANOL DAUN KACA PIRING (*Gardenia
augusta* Merr.) TERHADAP *Escherichia coli***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

SITI NUR AZIZAH HASYIM

NIM 152210101127

**BAGIAN BIOLOGI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk:

1. Allah SWT. yang telah memberi saya kesempatan, petunjuk, nikmat, serta rahmat sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini;
2. Ibunda Kholifah Tusa'diyah, Ayahanda Moch. Nur Hasyim dan Kakak Emy Fitriana Hasyim yang telah memberikan dorongan materil, moril, doa dan kasih sayang yang senantiasa mengiringi setiap langkah penulis;
3. Keluarga besar penulis di Jember, terima kasih atas dukungan, motivasi dan doa yang selalu mengiringi penulis untuk mencapai pendidikan yang lebih tinggi;
4. Guru-guru penulis sejak Taman Kanak-kanak (TK) hingga Sekolah Menengah Atas (SMA), dosen, laboran dan segenap civitas akademika yang telah memberikan ilmu dan mendidik penulis dengan penuh kesabaran;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

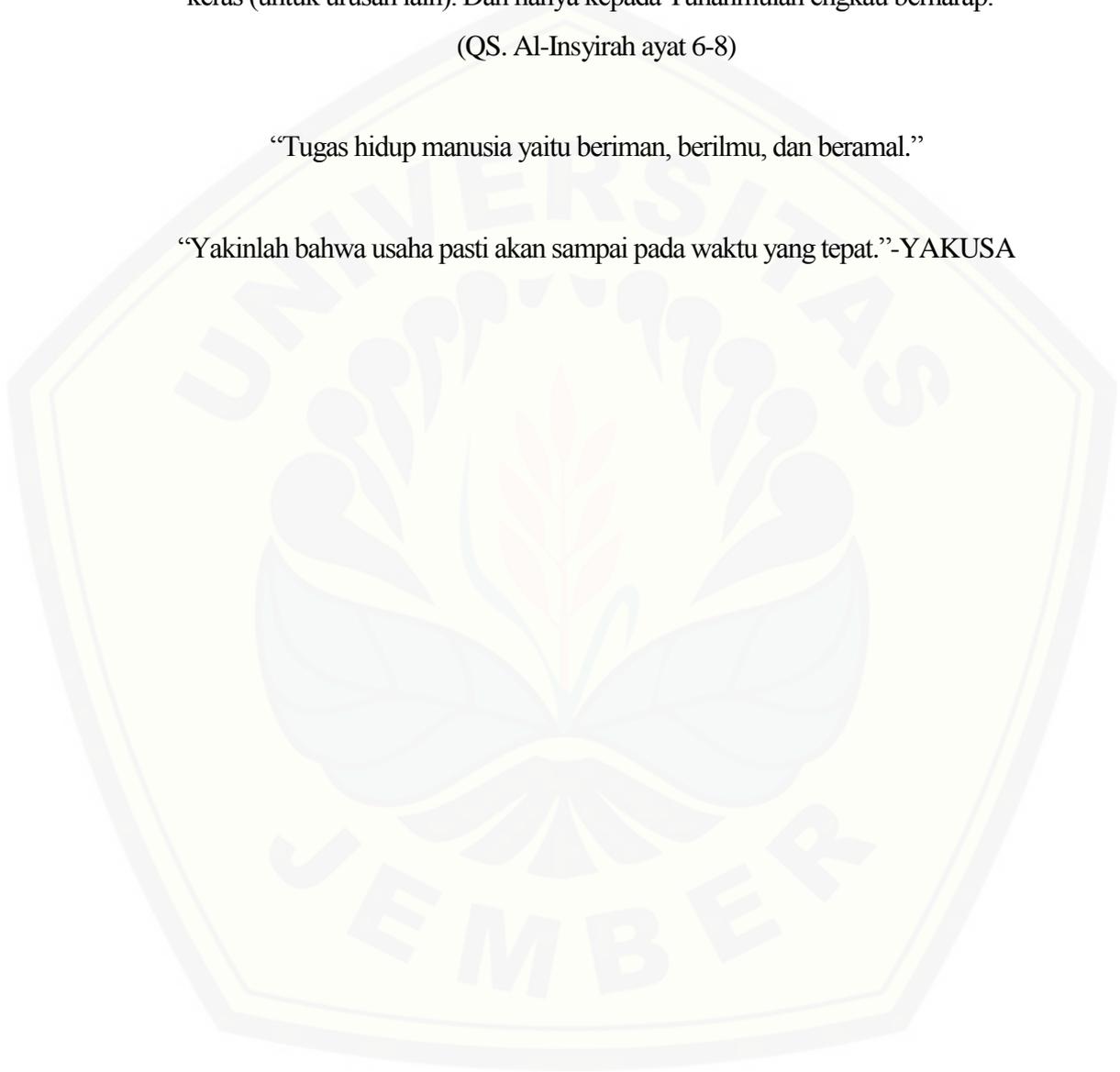
MOTTO

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.”

(QS. Al-Insyirah ayat 6-8)

“Tugas hidup manusia yaitu beriman, berilmu, dan beramal.”

“Yakinlah bahwa usaha pasti akan sampai pada waktu yang tepat.”-YAKUSA



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Siti Nur Azizah Hasyim

NIM : 152210101127

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kaca Piring (*Gardenia augusta* Merr.) Terhadap *Escherichia coli*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Dengan pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika pernyataan dikemudian hari ini tidak benar.

Jember, 11 September 2019

Yang menyatakan,

Siti Nur Azizah Hasyim

NIM 152210101127

SKRIPSI

**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
EKSTRAK ETANOL DAUN KACA PIRING (*Gardenia
augusta* MERR.) TERHADAP *Escherichia coli***

Oleh:

Siti Nur Azizah Hasyim

NIM 1152210101127

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dewi Dianasari, S. Farm., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Nuri, S. Si., Apt., M. Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kaca Piring (*Gardenia augusta* Merr.) Terhadap *Escherichia coli*” karya Siti Nur Azizah Hasyim telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 11 September 2019

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Dewi Dianasari, S. Farm., M. Farm., Apt.
NIP. 198712082014042002

Nuri, S. Si., Apt., M. Si.
NIP. 196904122001121007

Tim Penguji

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

Indah Yulia Ningsih, S. Farm., M. Farm., Apt.
NIP. 198407122008122002

Endah Puspitasari, S. Farm.,
M. Sc., Apt.
NIP. 198107232006042002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

Lestyo Wulandari, S. Si., Apt., M. Farm.
NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kaca Piring (*Gardenia augusta* Merr.) Terhadap *Escherichia coli*; Siti Nur Azizah Hasyim, 1522101011127; 2019; 36 Halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Diare merupakan bertambahnya defekasi (buang air besar) lebih dari tiga kali sehari, disertai dengan perubahan tinja menjadi cair dengan atau tanpa darah dalam waktu 24 jam. Dari beberapa penyebab diare, infeksi merupakan salah satu penyebab diare yang disebabkan oleh beberapa bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan seperti *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragile*, dan *Campylobacter*. Bakteri *E. coli* menempati urutan kedua sebagai penyebab infeksi diare setelah rotavirus. Terapi infeksi yang disebabkan oleh bakteri selama ini menggunakan antibakteri. Penggunaan antibakteri yang tidak tepat dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri. Salah satu strategi yang dapat mengatasi resistensi adalah dengan menemukan inovasi antibakteri dari bahan alam.

Salah satu tanaman dari genus *Gardenia* yang banyak tersebar di Indonesia adalah *Gardenia augusta* Merr. *G. augusta* Merr. memiliki kekerabatan dengan *Gardenia coronaria*, *Gardenia latifolia* Ait., dan *Gardenia gummifera* Linn. Berdasarkan kemotaksonomi dalam genus yang sama maka *G. augusta* Merr. diduga memiliki kandungan metabolit sekunder dan aktivitas yang sama sehingga berpotensi sebagai antibakteri. Namun, belum ditemukan data penelitian mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr.

Dalam penelitian ini dilakukan skrining fitokimia dan pembuktian ilmiah adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr terhadap *E. coli*. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. menggunakan metode difusi cakram dengan gentamisin sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Penggunaan metode difusi cakram ditujukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dengan melihat adanya zona bening di sekitar cakram.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. adalah alkaloid, saponin, flavonoid, terpenoid, polifenol, steroid dan tidak mengandung tanin. Pada uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram menggunakan 4 seri konsentrasi yaitu 10, 20, 30, dan 40% b/v menghasilkan diameter zona hambat berturut-turut sebesar $6,43 \pm 0,02$, $7,35 \pm 0,05$, $8,42 \pm 0,03$, dan $9,45 \pm 0,04$ mm. Hasil uji statistik *One Way ANOVA* diameter zona hambat diperoleh nilai $p=0,000$. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada setiap konsentrasi yang diuji.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kaca Piring (*Gardenia augusta* Merr.) Terhadap *Escherichia coli*”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak dan pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember Ibu Lestyo Wulandari, S. Si., Apt., M. Farm. atas kesempatannya yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
2. Bapak Antonius Nugraha Widhi P. S. Farm., M.P.H., Apt. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan memberikan arahan selama penulis menjadi mahasiswa;
3. Ibu Dewi Dianasari, S. Farm., M. Farm., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan Bapak Nuri, S. Si., Apt., M. Si. selaku dosen pembimbing anggota yang penuh kesabaran membimbing dalam menyelesaikan skripsi ini;
4. Ibu IndahYulia Ningsih, S. Farm., M. Farm., Apt. selaku dosen penguji I dan Ibu Endah Puspitasari S. Farm., M. Sc., Apt. selaku dosen penguji II, terima kasih atas saran dan kritik yang telah diberikan demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Segenap dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmunya selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Pada teksini laboratorium, Bu Widi dan Mbak Parka yang telah banyak membantu selama proses penelitian;
7. Ibunda Kholifah Tusa'diyah, Ayahanda Moch. Nur Hasyim dan Kakak Emy Fitriana Hasyim yang telah memberikan dorongan materil, moril, doa, dan kasih sayang yang senantiasa mengiringi setiap langkah penulis;
8. Keluarga besar penulis di Jember, terima kasih atas dukungan, motivasi dan doa yang selalu mengiringi penulis untuk mencapai pendidikan yang lebih tinggi;

9. Guru-guru penulis sejak taman Kanak-kanak (TK) hingga Sekolah Menengah Atas (SMA), dosen, laboran dan segenap civitas akademika yang telah memberikan ilmu dan mendidik penulis dengan penuh kesabaran;
10. Teman-teman farmasi angkatan 2015 “Libitum” yang selalu memberikan semangat;
11. Teman-teman seperjuangan skripsi Kaca Piring (Mohammad Thahir dan I Wayan Seniarta) atas kerja sama dan bantuannya hingga skripsi ini berakhir;
12. Teman karib “Lotus Flowers” (Mbak Tiyas dan Mbak Firda) yang telah memberikan dorongan motivasi dengan penuh kesabaran;
13. Teman kosan (Mbak Wilda, Mbak Kikin, Rani, Wulan, Lista, Siska, Livia, Popon dan Ana) yang telah memberikan keceriaan kepada penulis;
14. Seluruh keluarga besar Tanaszaha Komisariat Unej (Geo, Nabil, Erna, Mela, Tacik, Alif, Ali, Papang, Pupung Dan Pendi) yang telah memberikan pengalaman dan menjadi keluarga selama penulis berada di Jember;
15. Seluruh keluarga besar HMI Cabang Jember terutama anggota Komisariat Kesehatan (Arif, Mbak Riza, Mbak Nia, Mas Dani, Zum, Diah, Anti, Icut dan Anisa) yang telah memberikan pengalaman dan menjadi keluarga selama penulis berada di Jember;

Penulis juga menerima segala saran dan kritik yang membangun dari semua pihak guna kesempurnaan skripsi ini. Selain itu, penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat untuk semuanya.

Jember, 11 September 2019

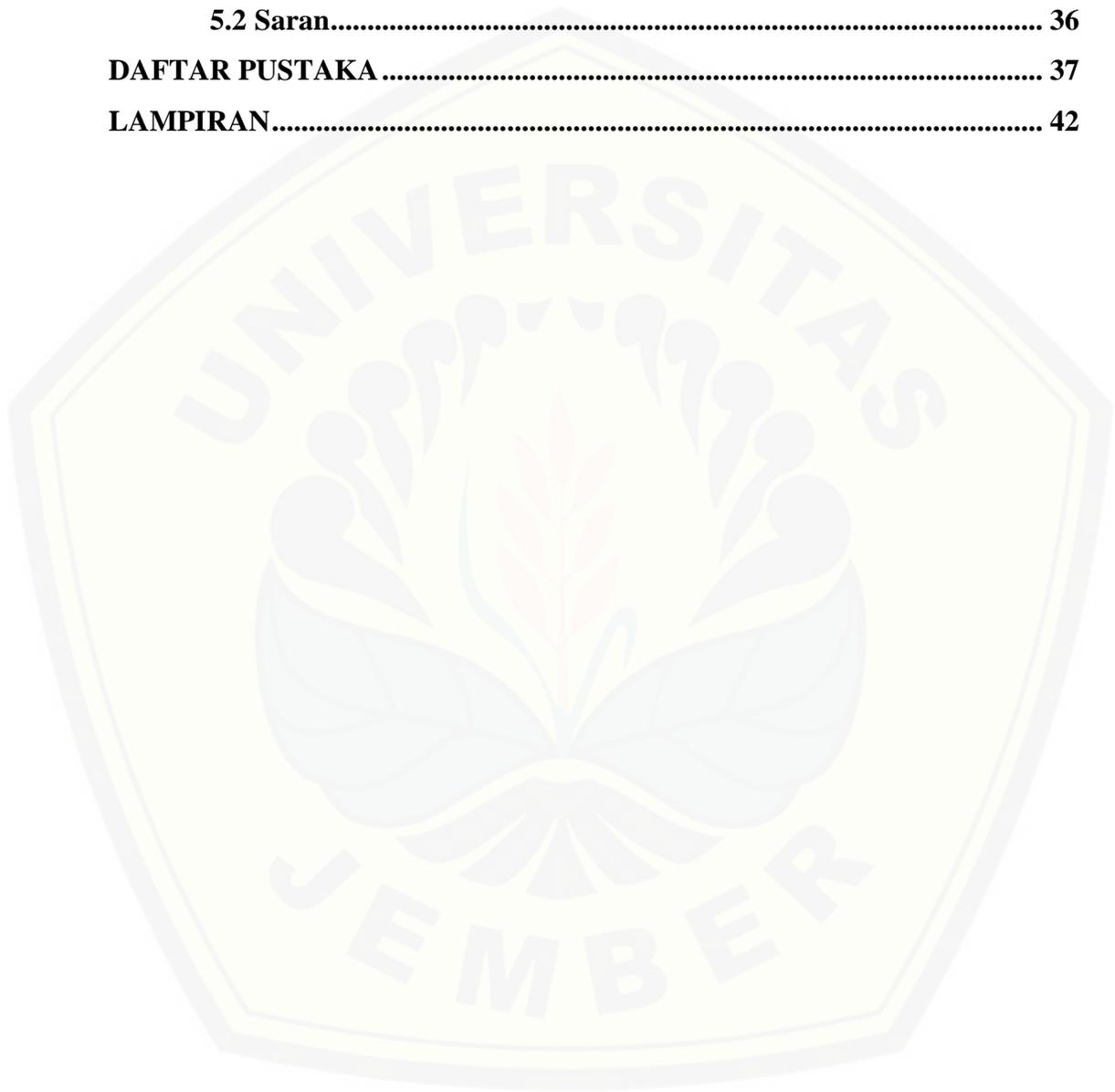
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vii
HALAMAN PENGESAHAN	vii
HALAMAN RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Diare.....	5
2.2 Tinjauan Bakteri <i>Escherichia coli</i>	7
2.3 Tinjauan Antibakteri	8
2.4 Tinjauan <i>G. augusta</i> Merr	9
2.4.1 Klasifikasi Tanaman.....	9
2.4.2 Morfologi dan Habitat.....	10
2.4.3 Nama Daerah.....	10
2.4.4 Kandungan Kimia	11
2.4.5 Khasiat Tanaman	11

2.5 Metode Ekstraksi.....	11
2.6 Skrining Fitokimia	13
2.7 Metode Pengujian Antibakteri.....	15
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	17
3.1 Jenis Penelitian	17
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.3 Alat dan Bahan Penelitian.....	17
3.4 Rencana Penelitian.....	18
3.5 Variabel Penelitian.....	19
3.6 Definisi Penelitian.....	19
3.7 Prosedur Kerja	20
3.7.1 Identifikasi Tanaman.....	20
3.7.2 Pembuatan Simplisia.....	20
3.7.3 Pembuatan Ekstrak.....	20
3.7.4 Skrining Fitokimia.....	21
3.8 Uji Aktivitas Antibakteri.....	25
3.8.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	25
3.8.2 Pembuatan Media.....	25
3.8.3 Pembuatan Biakan Murni.....	26
3.8.4 Peremajaan Bakteri Uji	26
3.8.5 Pembuatan Suspensi Mc Farland 0,5	26
3.8.6 Pembuatan Suspensi <i>E. coli</i> (inokulum)	26
3.8.7 Pembuatan Kontrol Negatif.....	26
3.8.8 Penyiapan Kontrol Positif	26
3.8.9 Pembuatan Larutan Uji.....	27
3.8.10 Penentuan Aktivitas Antibakteri	27
3.9 Analisis Data	27
3.10 Skema Penelitian	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1 Determinasi Tanaman <i>G. augusta</i> Merr	29
4.2 Ekstraksi Daun <i>G. augusta</i> Merr	29

4.3 Skrining Fitokimia Ekstrak <i>G. augusta</i> Merr	29
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak <i>G. augusta</i> Merr	33
BAB 5. KESIMPULAN	36
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	42



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil ekstraksi simplisia daun <i>G. augusta</i> Merr.....	29
Tabel 4.2 Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun <i>G. augusta</i> Merr.....	32
Tabel 4.3 Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun <i>G. augusta</i> Merr...	34



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	7
Gambar 2.2 Tanaman <i>Gardenia augusta</i> Merr.....	10
Gambar 3.1 Rancangan skematis penelitian.....	18
Gambar 3.2 Skema kerja penelitian.....	28
Gambar 4.1 Skrining fitokimia secara KLT.....	30
Gambar 4.2 Skrining fitokimia secara <i>tube test</i>	31
Gambar 4.3 Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun <i>G. augusta</i> Merr	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Hasil determinasi tanaman <i>G. augusta</i> Merr.....	42
Lampiran B. Hasil rendemen ekstrak etanol daun <i>G. augusta</i> Merr.....	43
Lampiran C. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun <i>G. augusta</i> Merr.....	44
Lampiran D. Perhitungan konsentrasi uji ekstrak etanol daun <i>G. augusta</i> Merr..	48
Lampiran E. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun <i>G. augusta</i> Merr.....	49
Lampiran F. Hasil uji statistik ekstrak etanol daun <i>G. augusta</i> Merr.....	50

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diare didefinisikan sebagai bertambahnya defekasi (buang air besar) lebih dari tiga kali sehari, disertai dengan perubahan tinja menjadi cair dengan atau tanpa darah dalam waktu 24 jam. Berdasarkan lamanya diare, diare diklasifikasikan menjadi 3 yaitu diare akut, diare non akut, dan diare kronis. Diare akut adalah diare yang terjadi dalam waktu kurang dari 14 hari. Diare non akut adalah diare yang terjadi dalam waktu lebih dari 14 hari. Sedangkan diare kronis adalah diare yang terjadi dalam waktu lebih dari 30 hari (Koda-Kimble, 2009).

Menurut Riset Kesehatan Dasar (2016), diare merupakan penyakit endemis di Indonesia yang sering disertai dengan kematian serta memiliki potensi KLB (Kejadian Luar Biasa). Jumlah penderita diare terus meningkat setiap tahunnya. Berdasarkan data dari Riskesdas pada tahun 2015 prevalensi penderita diare di fasilitas kesehatan sebesar 5.097.247 dan sekitar 4.017.861 diare yang tertangani dengan prosentase sebesar 74,33%. Pada tahun 2016 prevalensi penderita diare di fasilitas kesehatan sebesar 6.897.463, dan sekitar 2.544.084 diare yang tertangani dengan prosentase sebesar 26,9% (Riskesdas, 2017). Pada tahun 2017 prevalensi penderita diare di fasilitas kesehatan sebesar 7.077.299, dan sekitar 4.274.790 diare yang tertangani dengan prosentasi sebesar 60,4% (Riskesdas, 2018). Jumlah ini meningkat dibandingkan dari data tahun 2015 dan 2016.

Dari beberapa penyebab diare, infeksi merupakan salah satu penyebab diare yang disebabkan oleh beberapa bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan seperti *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragile*, dan *Campylobacter* (Koda-Kimble, 2009). Pada penelitian Monem dkk. (2014) menyebutkan bahwa bakteri *E. coli* menempati urutan kedua sebagai penyebab infeksi diare setelah rotavirus. Terapi infeksi yang disebabkan oleh bakteri selama ini menggunakan antibakteri.

Penggunaan antibakteri yang tidak tepat dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri. Salah satu strategi yang dapat mengatasi resistensi adalah dengan menemukan inovasi antibakteri dari bahan alam. Indonesia memiliki berbagai ragam jenis tumbuhan. Hampir semua jenis tumbuhan dapat tumbuh di Indonesia. Sekitar 9.600 spesies yang tumbuh di Indonesia dapat digunakan sebagai obat dan kurang dari 300 spesies diantaranya digunakan untuk bahan obat tradisional (Depkes RI, 2007). Tumbuhan mengandung metabolit sekunder sehingga tumbuhan dapat digunakan sebagai obat. Banyak penelitian yang telah membuktikan adanya aktivitas antibakteri yang berasal dari metabolit sekunder tumbuhan. Beberapa metabolit sekunder tumbuhan antara lain terpenoid, flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, dan glikosida. Metabolit sekunder terpenoid (Mariajancyrani dkk., 2013), flavonoid (Sukadana, 2010), alkaloid (Pfoze dkk., 2011), tanin (Doss dkk., 2009), dan saponin (Akinpelu dkk., 2014) dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

Tanaman famili Rubiaceae dari genus *Gardenia* merupakan salah satu tanaman yang berpotensi memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Penelitian Chowdhury dkk. (2014) menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun *Gardenia coronia* terhadap bakteri *E. coli* dengan konsentrasi 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL masing-masing menghasilkan diameter zona hambat sebesar 11 mm, 12 mm, 13 mm, dan 15 mm menggunakan metode difusi cakram. Penelitian Tamilselvi dkk. (2017) menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *Gardenia latifolia* Ait. terhadap *E. coli* dengan konsentrasi 200 µg/mL menghasilkan diameter zona hambat sebesar 8 mm menggunakan metode difusi cakram. Penelitian (Vaibhavi dkk., 2016) menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol batang *Gardenia gummifera* Linn. terhadap *E. coli* dengan konsentrasi 100 µg/mL, 200 µg/mL masing-masing menghasilkan diameter zona hambat sebesar 12 mm dan 15 mm menggunakan metode difusi sumuran.

Analisis fitokimia yang dilakukan oleh Uddin dkk. (2014) menunjukkan adanya sejumlah metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak metanol daun *Gardenia jasminoides* yaitu flavonoid, glikosida, alkaloid, tanin dan steroid.

Penelitian Kumar dkk. (2017) menunjukkan adanya metabolit sekunder flavonoid, glikosida, terpenoid, alkaloid, tanin, dan saponin yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun *Gardenia gummifera* Linn. Dari penelitian-penelitian tersebut menunjukkan tanaman dari famili Rubiaceae dan genus *Gardenia* berpotensi menjadi agen antibakteri.

Salah satu tanaman dari genus *Gardenia* yang banyak tersebar di Indonesia adalah *Gardenia augusta* Merr. *G. augusta* Merr. berasal dari Jepang dan Cina. Selain itu *G. augusta* Merr. biasa ditemukan sebagai tanaman hias di pekarangan daerah pegunungan ketinggian 400 mdpl dan akan berbuah jika berada di ketinggian sekitar 3.000 kaki dpl (Dalimartha, 2003). *G. augusta* Merr. memiliki kekerabatan dengan *Gardenia coronaria*, *Gardenia latifolia* Ait., dan *Gardenia gummifera* Linn. Berdasarkan kemotaksonomi dalam genus yang sama maka *G. augusta* Merr. diduga memiliki kandungan metabolit sekunder dan aktivitas yang sama.

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan secara ilmiah adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. Penelitian diawali dengan skrining fitokimia dan dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram. Skrining fitokimia yang dilakukan ditujukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. Sedangkan metode difusi cakram yang dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol *G. augusta* Merr. terhadap pertumbuhan *E. coli*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

- a. Apakah ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol, terpenoid, steroid dan tanin?
- b. Apakah ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *E. coli*?
- c. Apakah terdapat perbedaan signifikan nilai diameter hambat setiap konsentrasi ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr.?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

- a. Mengetahui kandungan alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol, terpenoid, steroid dan tanin di dalam ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr.
- b. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. terhadap pertumbuhan *E. coli* dengan mengetahui nilai diameter zona hambat ekstrak.
- c. Mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan pada nilai diameter hambat setiap konsentrasi ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan manfaat sebagai berikut:

- a. Memberikan informasi kepada masyarakat tentang potensi daun *G. augusta* Merr. sebagai agen antibakteri terhadap *E. coli*.
- b. Sebagai dasar penelitian selanjutnya untuk pengembangan obat dari bahan alam yang berpotensi sebagai antibakteri khususnya pengobatan alternatif untuk diare.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Diare

Diare didefinisikan bertambahnya defekasi (buang air besar) lebih dari tiga kali sehari, disertai dengan perubahan menjadi cair dengan atau tanpa darah dalam waktu 24 jam. Berdasarkan lamanya diare, diare diklasifikasikan menjadi 3 yaitu diare akut, diare non akut, dan diare kronis. Diare akut adalah diare yang terjadi dalam waktu kurang dari 14 hari. Diare non akut adalah diare yang terjadi dalam waktu lebih dari 14 hari. Sedangkan diare kronis adalah diare yang terjadi dalam waktu lebih dari 30 hari (Koda-Kimble, 2009). Definisi lain diare merupakan buang air besar sedikitnya tiga kali atau lebih dalam waktu 24 jam disertai salah satu gejala mual, muntah, kram perut, demam $>38^{\circ}\text{C}$ atau kram perut (Al-Gallas dkk., 2007).

Adapun penyebab diare dapat dikelompokkan sebagai berikut:

a. Infeksi

Diare yang disebabkan karena infeksi diawali dengan proses adanya mikroorganisme yang masuk ke dalam saluran pencernaan yang selanjutnya berkembang di dalam usus dan mengakibatkan kemampuan fungsi usus bekerja secara tidak optimal. Agen penyebabnya adalah bakteri (*Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*), Virus (*Rotavirus*, *Adenovirus*), Parasit (Protozoa= *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Balantidium coli*; Cacing= *Blastocystis hominis*, *Ascaris*, *Trichuris*).

b. Alergi makanan

Sebagian tubuh adakalanya tidak tahan terhadap makanan-makanan tertentu, seperti alergi laktosa yang terkandung pada susu sapi.

c. Keracunan

Keracunan oleh bahan kimia maupun keracunan oleh bahan yang dikandung dan diproduksi oleh makhluk hidup (seperti racun yang dihasilkan oleh alga, sayur-sayuran, ikan, buah-buahan, dan jasad renik) dapat menyebabkan diare.

d. Malabsorpsi

Kegagalan usus dalam melakukan absorpsi dapat mengakibatkan tekanan osmotik meningkat serta akan terjadi pergeseran air dan elektrolit ke rongga usus, sehingga dapat meningkatkan ketidakmampuan usus dalam menyerap zat-zat makanan tertentu dan kemudian akan menyebabkan diare.

e. Sebab-sebab lain

Faktor perilaku yang menerapkan kebiasaan buang air besar di sungai, ketersediaan air bersih yang tidak memadai juga dapat menyebabkan diare (Depkes RI, 2011).

Berdasarkan Dipiro dkk. (2009) penggolongan obat diare secara garis besar adalah sebagai berikut:

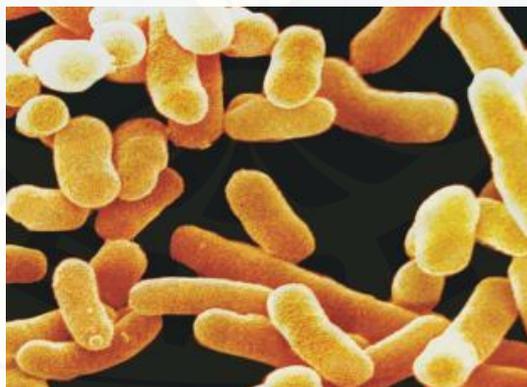
- a. Antimotilitas merupakan obat-obatan yang dapat menghambat pergerakan usus sehingga frekuensi diare berkurang. Contoh obat golongan antimotilitas adalah *loperamide, difenoxin, dan diphenoxylate*.
- b. Absorben merupakan obat-obatan yang dapat menyerap air, racun, dan meningkatkan kekentalan tinja. Contoh obat golongan absorben adalah *attapulgit* dan *kaolin-pektin*.
- c. Antisekretori merupakan obat-obatan yang berkerja dengan menghambat sekresi serta meningkatkan absorpsi elektrolit pada usus ke jaringan sehingga sekresi elektrolit menjadi normal. Contoh obat golongan antisekretori adalah *bismuth subsalicylate* dan enzim (laktase).
- d. Antibiotik merupakan obat-obatan yang digunakan pada diare yang disebabkan karena adanya infeksi bakteri. Fungsi antibiotik adalah untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Contoh obat golongan antibiotik adalah *nifural*.

2.2 Tinjauan Bakteri *Escherichia coli*

Berikut merupakan klasifikasi dari bakteri *E. coli*:

Kingdom : Bacteria
Sub Kingdom: Nagibacteria
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gamma Proteobacter
Ordo : Enterobacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli* (ITIS, 2017).

E. coli merupakan bakteri gram negatif berbentuk silinder, berspora, dan membentuk koloni halus dengan tepi yang jelas. Morfologi *E. coli* dapat dilihat pada gambar 2.1. Ciri-ciri bakteri *E. coli* memberikan hasil positif ketika dites lisin dekarboksilasi, diol dan fermentasi manitol serta menghasilkan gas yang berasal dari glukosa (Jawetz dkk., 2007). Bakteri *E. coli* mempunyai ukuran 1-2 mikron X 30-30 mikron (1 mikron = 0,001 mm) dan dapat tumbuh dengan mudah pada suhu 37°C (Wiwanitkit, 2011).



Gambar 2.1 Bakteri *Escherichia coli* (Sumber: Manning, 2010)

E. coli merupakan bakteri yang dapat tumbuh dengan optimum pada suhu 20-45°C dan pada pH 5,5-8. *E. coli* memiliki suhu pertumbuhan maksimum 40-45°C, di atas suhu tersebut bakteri akan mengalami inaktivasi (Jawetz dkk., 2007). *E. coli* juga merupakan penyebab umum terjadinya ISK (Infeksi Saluran

Kemih) $\pm 90\%$ pada perempuan muda di Indonesia dengan gejala frekuensi kencing disuria, hematuria dan pyuria. Selain itu *E. coli* juga menyebabkan diare. Berdasarkan sifat virulensinya, diare dibedakan menjadi lima yaitu *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC) atau penyebab umum traveler diare, *Enteropatogenic E. coli* (EPEC) atau penyebab utama di negara berkembang yang ditandai dengan diare berair, *Enteroadhensive E. coli* (EAEC) atau penyebab diare kronis dengan durasi lebih dari 14 hari, *Enteroinvasive E. coli* (EIEC) menghasilkan penyakit dengan menginvasi sel epitel mukosa usus, dan *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC) yang dikaitkan pendarahan pada kolitis (Jawetz dkk., 2013).

2.3 Tinjauan Antibakteri

Antibakteri merupakan obat yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri, khususnya bakteri yang dapat merugikan manusia. Bahan antibakteri adalah bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan ataupun bahkan membunuh bakteri. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi dua macam, yaitu aktivitas bakterisidal yang dapat membunuh bakteri dan aktivitas bakteriostatik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Barreto, 2005). Berdasarkan spektrum dari aktivitasnya agen antibakteri dibedakan menjadi spektrum luas dan spektrum sempit. Antibakteri spektrum luas adalah antibakteri yang dapat melawan bakteri patogen gram positif maupun bakteri gram negatif. Sedangkan antibakteri spektrum sempit adalah antibakteri yang hanya dapat melawan bakteri gram positif atau antibakteri yang hanya melawan bakteri gram negatif (Ullah dkk., 2017). Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri terbagi dalam 4 kelompok yaitu antibakteri yang mengganggu metabolisme sel, antibakteri yang menghambat sintesis dinding, antibakteri yang menghambat fungsi membran, antibakteri yang mengganggu sintesis dan antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat (Talaro, 2009).

Antibakteri yang umum digunakan yaitu penisilin, sefalosporin, dan aminoglikosida. Penisilin digolongkan sebagai obat golongan beta-laktam karena

mempunyai cincin laktam dengan 4 anggota. Mekanisme kerja penisilin adalah menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat sintesis dinding sel. Secara kimiawi penisilin mempunyai mekanisme kerja dan toksisitas yang serupa dengan sefalosporin. Akan tetapi sefalosporin lebih stabil daripada penisilin terhadap banyak bakteri beta-laktamase. Sedangkan aminoglikosida merupakan antibakteri bakteriosid yang larut dalam air dan stabil dalam larutan. Aminoglikosida memiliki mekanisme kerja menghambat sintesis protein yang bersifat *irreversible* sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Salah satu golongan aminoglikosida adalah gentamisin (Katzung, 2004).

2.4 Tinjauan *G. augusta* Merr.

2.4.1 Klasifikasi Tanaman *G. augusta* Merr.

Tumbuhan *G. augusta* Merr. ditunjukkan pada Gambar 2.2 dan klasifikasinya adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Sub Kingdom : Vridiplantae
Super Divisi : Embryophyta
Sub Divisi : Spermatophyta
Kelas : Magnoliopsida
Super Ordo : Asteranae
Ordo : Gentianales
Famili : Rubiaceae
Genus : *Gardenia*
Spesies : *Gardenia augusta* Merr.

Sinonim : *Gardenia jasminoides*
Gardenia angusta Merr. (ITIS, 2017).



Gambar 2.2 Tanaman *Gardenia angusta* Merr. (Dalimartha, 2003)

2.4.2 Morfologi dan Habitat Tanaman *G. angusta* Merr.

Tanaman *G. angusta* Merr. merupakan tanaman perdu tegak yang memiliki tinggi 1-2 meter, mempunyai batang bulat dan berkayu, bercabang, ranting muda, dan daunnya berlapis lilin. Letak daun berhadapan atau berkarang 3, tebal, licin seperti kulit, bertangkai pendek, bentuknya elips atau bulat telur, ujung dan pangkalnya runcing. Tepi rata, permukaan atas mengkilap, panjang daun 4,5-13 cm, lebar daun 2-5 cm, warnanya hijau tua. Bunga tunggal, bertangkai pendek, warnanya putih, dan baunya harum. Buah bentuknya bulat telur, kulitnya tipis, mengandung pigmen berwarna kuning, dan berbiji minyak.

G. angusta Merr. berasal dari Jepang dan Cina. Kemudian tanaman *G. angusta* Merr. mengalami persebaran ke daerah-daerah tropik lainnya hingga ke Asia Tenggara. Persebaran tanaman ini di Indonesia meliputi Sumatera, Maluku, Bali, dan Jawa. Tanaman ini dapat ditemukan sebagai tanaman hias di perkarangan daerah dengan ketinggian 400 mdpl dan akan berbuah jika berada di ketinggian 3000 kaki dpl (Dalimartha, 2003).

2.4.3 Nama Daerah Tanaman *G. angusta* Merr.

Tanaman *G. angusta* Merr. mempunyai beberapa nama daerah yaitu meulu break, raja putih (Sumatera); kaca piring (sunda); kacapiring, peciring,

cepiring, ceplokpiring (Jawa); kacaping, sangklapa (Nusa Tenggara); dan Jempiring (Bali) (Dalimartha, 2003).

2.4.4 Kandungan Kimia Tanaman *G. augusta* Merr.

Buah *G. augusta* Merr. mengandung minyak atsiri, gardenin ($C_{14}H_{12}O_6$ atau $C_{23}H_{30}O_{10}$), gardenosid, geniposid (genipin-1-glukoside), genipin-1- β -D-gentiobioside, gardoside (8,10-dehydrologanin), scandoside methyl ester, glikosid, β -sitosterol, α -mannitol, nonacosane, krosetin, krosin ($C_{44}H_{64}O_{24}$), klorogenin, tanin, dan dekstros. Gardenin merupakan kristal berwarna kuning emas, larut dalam alkohol dan kloroform. Kulit buah mengandung *ursolic acid*. Daun mengandung saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri (Dalimartha, 2003).

2.4.5 Khasiat Tanaman *G. augusta* Merr.

Buah kaca piring berkhasiat sebagai antiinflamasi, peluruh dahak, peluruh kencing (diuretik), penawar racun (detoksikan), penghenti perdarahan (hemostatis), meningkatkan fungsi hati dan menenangkan (sedatif), melancarkan aliran empedu. Akar dan bunganya berkhasiat untuk peluruh haid. Sedangkan daun kaca piring berkhasiat untuk mengatasi sesak napas, demam, tekanan darah tinggi (hipertensi) dan sariawan (Dalimartha, 2003).

2.5 Metode Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Putra dkk., 2014).

Berdasarkan prinsipnya, proses ekstraksi akan terjadi ketika terdapat kesamaan sifat kepolarannya. Senyawa yang memiliki sifat polar maka senyawa tersebut akan larut dalam pelarut polar, begitu juga sebaliknya. Hal-hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut adalah toksisitas, selektivitas pelarut,

kemudahan untuk diuapkan, kemudahan dalam mendapatkannya dan harga yang ekonomis (Harborne, 2006).

Metode ekstraksi dibagi menjadi dua cara yaitu cara dingin dan cara panas (Depkes RI, 2000) :

1. Cara Dingin

- a. Maserasi adalah cara ekstraksi yang sederhana, maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk sampel pada pelarut. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut.

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan cara maserasi selama 2-3 hari dan dilanjutkan dengan remaserasi dengan dua kali penggantian pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruang. Kekurangan metode ekstraksi yaitu membutuhkan waktu yang lama dibandingkan refluks dan soxhlet, serta ekstrak air yang dihasilkan pada metode maserasi akan cepat rusak dan bau (Putra dkk., 2014). Sedangkan keuntungan dari metode ekstraksi adalah metodenya sederhana, caranya mudah, dan tidak perlu pemanasan sehingga kecil kemungkinan bahan alam akan rusak (Susanty dan Bachmid, 2016). Selain itu Ekstraksi biasanya dilakukan dengan maserasi karena maserasi menghasilkan rendemen ekstraksi yang tinggi (Saifudin, 2014).

- b. Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses ini terdiri dari tahapan pengebangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

2. Cara Panas

- a. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses

- pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.
- b. Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
 - c. Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 - 50°C.
 - d. Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15 - 20 menit).
 - e. Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (~30°C) dan temperatur sampai titik didih air.

2.6 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah metode yang dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung di dalam sampel yang diteliti. Metode skrining ini tergolong cepat, sederhana, dan dapat menegaskan metabolit sekunder yang terdapat di dalam sampel (Puspitasari dkk., 2013). Skrining fitokimia dapat dilakukan dengan *tube test* (reaksi warna dan pengendapan) dan uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Uji tabung dapat dilakukan dengan mereaksikan ekstrak dengan reagen tertentu. Sedangkan uji penegasan KLT dilakukan dengan menotolkan larutan ekstrak di atas lempeng KLT dan mengeluasi lempeng tersebut dalam fase gerak yang cocok, sehingga metabolit sekunder dapat terpisah berdasarkan tingkat kepolarannya dengan membentuk suatu noda (Wagner, 1996).

- a. Deteksi senyawa alkaloid: pengujian senyawa alkaloid dilakukan dengan tiga reagen yaitu reagen Wagner, Mayer, dan Dragendroff. Pada reagen Wagner, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan alkaloid sehingga membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap berwarna

coklat. Pada reagen Mayer, nitrogen yang terdapat pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraidomerkurat (II) dan membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap berwarna putih. Pada pereaksi Dragendroff, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan alkaloid sehingga membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap berwarna jingga (Nafisah dkk., 2014).

- b. Deteksi senyawa flavonoid: pengujian flavonoid dapat diidentifikasi melalui uji asetat dan uji alkalin. Uji asetat dilakukan dengan menambahkan larutan timbal asetat pada sampel yang kemudian akan terbentuk endapan berwarna kuning menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Sedangkan uji alkalin dilakukan dengan menggunakan larutan natrium hidroksida. Pembentukan warna kuning intensif dengan penambahan asam encer yang menunjukkan adanya flavonoid (Nafisah dkk., 2014).
- c. Deteksi senyawa saponin: pengujian senyawa saponin pada umumnya menggunakan metode Forth (uji buih dan busa). Metode ini merupakan metode yang sederhana untuk menunjukkan adanya senyawa saponin. Uji saponin menunjukkan hasil positif apabila setelah dikocok dan didiamkan terdapat busa yang stabil atau bertahan selama 2-4 menit (Nafisah dkk., 2014).
- d. Deteksi tanin: pengujian senyawa tanin dilakukan dengan menambahkan $FeCl_3$. Tanin merupakan golongan fenolik yang memiliki gugus hidrksl (OH) dan cincin aromatik. Ketika ekstrak ditambahkan dengan $FeCl_3$, maka $FeCl_3$ akan bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil pada senyawa tanin. Sehingga warna ekstrak yang dihasilkan berwarna hijau tua kehitaman yang menunjukkan adanya senyawa tanin pada ekstrak (Puspita dkk., 2013).
- e. Deteksi senyawa glikosida: pengujian senyawa glikosida dilakukan dengan uji Bontrager dimodifikasi dan uji Law's. Pada pengujian Bontrager dimodifikasi, pembentukan warna merah muda dilapisan amoniak yang menunjukkan adanya glikosida antranol. Sedangkan uji Law's, terbentuknya warna merah muda hingga merah darah menunjukkan adanya glikosida jantung (Tiwari dkk., 2011).

- f. Deteksi steroid dan terpenoid: pengujian senyawa steroid dan terpenoid dilakukan dengan uji Liebermann Burchard. Ketika ekstrak berubah warna menjadi warna biru, maka ekstrak mengandung senyawa steroid. Sedangkan apabila berwarna hijau, maka ekstrak mengandung senyawa triterpenoid (Nafisah dkk., 2014).

Adapun beberapa senyawa metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antibakteri dari tumbuhan antara lain senyawa alkaloid; terpenoid dan minyak atsiri; lesitin dan polipeptida; fenolik dan polifenol (polifenol sederhana, kuinon, asam fenolat, tannin, kumarin, flavon, flavonoid dan flavonol) (Ciocan dan Bara, 2007; Kumar dan Pandey, 2013).

2.7 Metode Pengujian Antibakteri

Metode uji antibakteri dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas senyawa terhadap pertumbuhan bakteri. Adapun beberapa metode yang dapat digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri adalah sebagai berikut (Balouiri dkk., 2016):

- a. Metode Difusi: metode ini dapat dilakukan dengan metode difusi cakram ataupun metode difusi sumuran. Kedua metode difusi ini dilakukan dengan cara menanam mikroba di dalam media agar padat yang sesuai. Kemudian mikroba diletakkan di atas media. Metode difusi sumuran dilakukan dengan memasukkan senyawa uji ke dalam lubang sumuran yang telah dibuat pada media. Sedangkan pada metode difusi cakram dilakukan dengan meletakkan kertas cakram yang telah diberi larutan uji di permukaan media. Media yang telah berisi bakteri dan larutan uji kemudian diinkubasi pada suhu 36-37^oC selama 18-24 jam. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar lubang ataupun disekitar kertas cakram. Besarnya diameter zona bening tersebut dapat menunjukkan kekuatan antibakteri.
- b. Metode Dilusi: metode dilusi dilakukan dengan pengenceran tabung atau pengenceran agar. Cara pengenceran dalam tabung dilakukan dengan

mengencerkan senyawa uji dengan media cair menjadi kelipatan setengahnya. Pengenceran agar dilakukan dengan menggunakan satu seri lempeng agar dengan konsentrasi senyawa uji yang berbeda. Kemudian diinokulasi dengan suspensi bakteri selama 24 jam dengan suhu 36-37°C. Adanya aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhannya dengan adanya kontrol.

- c. Metode Bioautografi: metode ini dapat dilakukan dengan bioautografi kontak ataupun dengan bioautografi langsung. Bioautografi kontak dilakukan dengan menggunakan prinsip difusi senyawa yang terpisah dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas (KK). Sedangkan bioautografi langsung dilakukan dengan mengamati daerah hambatannya secara langsung pada lempeng kromatografi yang sebelumnya disemprot dengan suspensi bakteri.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan *true experimental laboratories* yang bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder dan aktivitas antibakteri dengan mengukur diameter zona hambat ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. terhadap pertumbuhan *E. coli*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember pada bulan Mei 2019 hingga bulan Agustus 2019.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik (Sartorius CP224S), seperangkat alat KLT (Kromatografi Lapis Tipis), pinset, blender, serangkaian *rotary evaporator* (Heidolph), oven (Mettler), *hot plate*, seperangkat alat gelas (tabung reaksi, *beaker glass*, erlenmeyer, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, pipet ukur), spatula logam, jarum ose, *magnetic stirrer*, rak tabung reaksi, bunsen, *microtip*, *aluminium foil* (Klin-pak), *vortex* (Labnet), *waterbath*, inkubator (Gallenkamp), desikator, autoklaf (ALP), kertas saring, *micropipet* (Soxorex), *blank disc*, *swab*, jangka sorong, dan *laminar air flow* (Airtech).

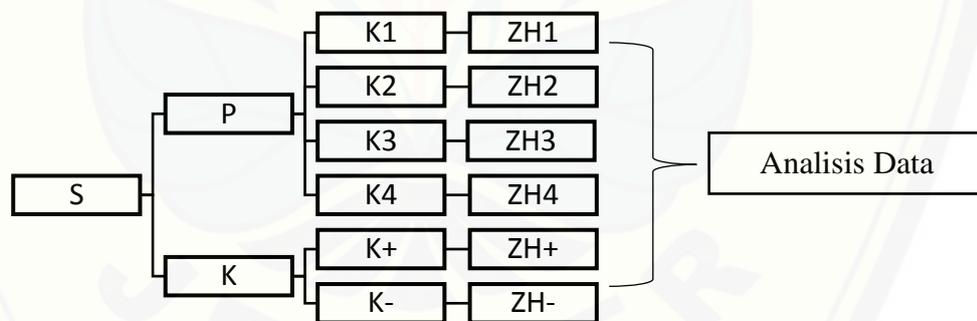
3.3.2 Bahan

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *G. augusta* Merr. yang diambil secara acak di Desa Sukoreno Kecamatan Umbulsari Kabupaten Jember. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etanol 96%. Bakteri uji yang digunakan adalah *E. coli* ATCC 25922. Media pertumbuhan

yang digunakan adalah *Muller Hinton Agar* (MHA) dan *Nutrient Agar* (NA). Bahan kimia yang digunakan untuk skrining fitokimia adalah pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendroff, HCl pekat, HCl encer, air, N-heksana, NaCl 10%, butanol, metanol, etil asetat, etanol 96%, kloroform, serbuk magnesium, gelatin, aseton, toluena, asetat anhidrad, H₂SO₄ pekat dan FeCl₃. Antibiotik pembanding yang digunakan adalah cakram gentamisin. Bahan yang digunakan untuk uji antibakteri adalah *Nutrient Agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), NaCl fisiologis 0,9%, McFarland 0,5 (BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%), dan dimetil sulfoksida (DMSO) 10%.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah *the post test control only group design*. Rancangan penelitian yang dilakukan yaitu uji difusi cakram. Pada uji difusi cakram diukur diameter zona hambatnya. Rancangan penelitian ditunjukkan pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rancangan skematis penelitian

Keterangan:

- S = Sampel ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr.
- P = Kelompok perlakuan
- K = Kelompok kontrol
- K1-K4 = Konsentrasi larutan uji (10%, 20%, 30%, 40%)
- K+ = Kontrol positif (Cakram Gentamisin 10 µg)
- K- = Kontrol negatif (DMSO 10%)
- ZH1-ZH4 = Hasil data diameter zona hambat larutan uji
- D+ = Hasil data diameter zona hambat kontrol positif
- D- = Hasil data diameter zona kontrol negatif

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada pengujian aktivitas antibakteri ini adalah ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. dalam empat konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30% dan 40%).

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian uji aktivitas antibakteri adalah diameter zona hambat.

3.5.2 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian adalah ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. yang dimaserasi dengan etanol 96%, metode difusi, prosedur penelitian, prosedur pengujian, waktu inkubasi, dan cara pengukuran diameter zona hambat.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Daun *G. augusta* Merr. diambil secara acak pada 2 tanaman dewasa di Desa Sukoreno Kecamatan Umbulsari Kabupaten Jember pada bulan Mei 2019.
2. Ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. adalah ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
3. Identifikasi metabolit sekunder dari ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. menggunakan *tube test* (reaksi warna dan pengendapan) dan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak.
4. Zona hambat ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. adalah kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Zona hambat diukur sebagai diameter zona hambat yaitu zona bening yang terdapat disekitar cakram dengan menggunakan alat bantu jangka sorong.

3.7 Prosedur Kerja

Prosedur kerja penelitian dimulai dari persiapan alat dan bahan hingga pengujian aktivitas antibakteri meliputi sebagai berikut:

3.7.1 Identifikasi tanaman (Determinasi)

Determinasi tanaman *G. augusta* Merr. dilakukan oleh Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember. Determinasi dilakukan untuk membuktikan bahwa pengambilan bahan utama yang akan digunakan pada analisis skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *E. coli* adalah valid.

3.7.2 Pembuatan simplisia

Daun segar *G. augusta* Merr. yang dipilih secara acak. Daun *G. augusta* Merr. disortir terlebih dahulu untuk dipisahkan dari daun yang kurang baik. Setelah itu daun dicuci untuk menghilangkan kotoran yang melekat. Kemudian daun dirajang untuk mempermudah proses penggilingan dan pengeringan. Selanjutnya daun dikeringkan pada udara terbuka dan dioven dengan suhu $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh simplisia daun *G. augusta* Merr. Setelah diperoleh simplisia, simplisia dihaluskan menggunakan mesin penghancur sampai terbentuk serbuk. Serbuk yang diperoleh ditimbang 200 gram untuk dilakukan proses ekstraksi.

3.7.3 Pembuatan ekstrak daun *G. augusta* Merr.

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Serbuk sampel 200 gram dimasukkan ke dalam maserator kemudian direndam dengan pelarut etanol 96% (perbandingan 1:10) sebanyak 2 liter selama 3 hari dilakukan pengadukan setiap 24 jam. Selanjutnya, maserat diperas dan dipisahkan dari residunya menggunakan kertas saring dengan corong *buchner*. Kemudian residunya dimasukkan kembali ke dalam maserator dan ditambahkan sisa pelarut dari hasil evaporator untuk dilakukan remaserasi. Hasil filtrat yang telah disaring selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Setelah itu ekstrak diuapkan menggunakan oven dengan suhu 45°C .

3.7.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder atau golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak. Pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia berdasarkan Harborne (1984) sebagai berikut :

1) Identifikasi Metabolit Sekunder Golongan Alkaloid

a. Penyiapan Sampel

Ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. sejumlah 0,3 gram ditambah dengan 5 mL HCl 2N dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2-3 menit sambil diaduk. Setelah dingin ditambahkan 0,3 gram NaCl lalu diaduk hingga homogen dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 5 mL HCl 2 N dibagi menjadi 4 bagian yakni sebagai larutan 1A, 1B, 1C, dan 1D.

b. Reaksi Pengendapan

Larutan 1A sebagai blanko. Larutan 1B ditambah dengan pereaksi Dragendorf, larutan 1C ditambah dengan pereaksi Mayer dan larutan 1D ditambah dengan pereaksi Wagner. Hasil uji dinyatakan positif apabila terdapat endapan berwarna merah jingga untuk pereaksi Dragendorf, endapan berwarna putih untuk pereaksi Mayer dan endapan berwarna coklat untuk pereaksi Wagner.

c. Kromatografi Lapis Tipis

Larutan 1D ditambah NH_4OH 28% sampai larutan menjadi basa. Setelah itu ditambahkan 5 mL kloroform dan disaring. Filtrat diuapkan hingga kering dan kemudian dilarutkan dalam metanol. Setelah itu dilakukan pengujian dengan metode KLT menggunakan fase diam berupa Keisel gel GF₂₅₄, fase gerak berupa etil asetat: metanol: air (9:2:2) dan penampak nodanya berupa pereaksi Dragendorf. Jika timbul warna jingga maka terdapat alkaloid di dalam ekstrak.

2) Identifikasi Metabolit Sekunder Golongan Saponin, Triterpenoid, dan Steroid.

a. Uji Buih

Ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. sejumlah 0,3 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah aquades sebanyak 10 mL,

dikocok kuat selama 30 detik. Uji buih dinyatakan positif mengandung saponin apabila terjadi buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan.

b. Reaksi Warna

Ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. sejumlah 0,3 gram dilarutkan ke dalam 15 mL etanol, lalu dibagi menjadi tiga bagian masing-masing 5 mL sebagai larutan 2A, 2B, dan 2C. Larutan 2A digunakan sebagai blanko dan larutan lainnya digunakan untuk pengujian.

1. Uji Libermann-Burchard

Larutan 2B ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat, lalu dikocok perlahan dan diamati terjadinya perubahan warna. Apabila terjadi warna hijau biru maka menunjukkan adanya saponin steroid, apabila terjadi warna merah ungu maka menunjukkan adanya triterpen steroid dan apabila terjadi warna kuning maka menunjukkan adanya saponin jenuh.

2. Uji Salkowski

Larutan 2C ditambah dengan 1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbulnya cincin berwarna merah.

c. Identifikasi dengan menggunakan KLT

Sejumlah 0,5 gram ekstrak ditambah 5 mL HCl 2N, didihkan dan ditutup corong berisi kapas basah selama 2 jam untuk menghidrolisis saponin. Larutan didinginkan dan dinetralkan dengan ammonia. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan 3 mL n-heksana sebanyak 3 kali. Selanjutnya larutan diuapkan sampai 0,5 mL lalu ditotolkan pada pelat KLT dengan kondisi analisis fase diam berupa Keisel gel GF₂₅₄, fase gerak berupa n-heksana: etil asetat (4:1) dan penampak noda berupa anisaldehyda asam sulfat dan dipanaskan. Jika terjadi perubahan warna merah ungu maka menunjukkan adanya saponin. Sedangkan untuk identifikasi terpenoid dan steroid bebas dilakukan pengambilan sedikit ekstrak yang kemudian ditambahkan beberapa tetes etanol, diaduk sampai larut dan ditotolkan

pada pelat KLT dengan kondisi analisis fase diam berupa Keisel gel GF₂₅₄, fase gerak berupa n-heksana: etil asetat (4:1) dan penampak noda berupa anisaldehyda asam sulfat dan dipanaskan. Adanya terpenoid atau steroid bebas ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu atau ungu.

3) Identifikasi Metabolit Sekunder Golongan Flavonoid

a. Reaksi Warna

Ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. sejumlah 0,3 gram dikocok dengan 3 mL n-heksana hingga tidak berwarna. Kemudian residu dilarutkan dalam etanol dan dibagi menjadi 4 bagian, masing-masing dinyatakan sebagai larutan 3A, 3B, 3C, dan 3D. Larutan 3A digunakan sebagai blanko dan larutan lainnya digunakan sebagai larutan uji.

1. Uji Bate-Smith dan Metcalf

Larutan 3B ditambahkan dengan 0,5 mL HCl pekat dan diamati perubahan warnanya. Kemudian dipanaskan di atas penangas air dan diamati lagi perubahan warna yang terjadi. Apabila perlahan-lahan terjadi perubahan warna menjadi warna merah terang atau ungu maka menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin.

2. Uji Wilstater

Larutan 3C ditambah 0,5 mL HCL pekat dan 4 potong magnesium. Kemudian amati perubahan warna yang terjadi. Diencerkan dengan 0,5 mL aquades dan 1 mL butanol. Kemudian diamati warna yang terjadi di setiap lapisan. Perubahan warna merah jingga maka menunjukkan adanya flavon, perubahan merah pucat maka menunjukkan adanya flavonol dan perubahan berwarna merah tua maka menunjukkan adanya flavanon.

b. Identifikasi dengan menggunakan KLT

Larutan 3D ditotolkan pada fase diam. Uji KLT ini menggunakan kondisi analisis fase diam berupa Kiesel gel GF₂₅₄, fase gerak berupa butanol: asam asetat glasial: air (4:1:5), dan penampak noda berupa uap ammonia. Jika terdapat noda berwarna kuning intensif maka menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

4) Identifikasi Metabolit Sekunder Golongan Polifenol dan Tanin

a. Reaksi Warna

Sejumlah 0,3 gram ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL aquades panas dan diaduk hingga homogen. Setelah itu dibiarkan hingga temperatur kamar. Sampel ditambahkan 3-4 tetes 10% NaCl yang selanjutnya diaduk dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian masing-masing ± 3 mL yaitu larutan 4A, 4B, dan 4C. Larutan 4A digunakan sebagai blanko dan larutan lainnya digunakan sebagai larutan uji.

1) Uji Gelatin

Pada larutan 4B ditambahkan dengan sedikit gelatin dan 5 mL larutan NaCl 10%. Jika terjadi endapan berwarna putih setelah penambahan gelatin maka menunjukkan adanya tanin.

2) Uji Ferriklorida

Pada larutan 4C ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 , kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Jika terjadi perubahan warna hijau kehitaman maka menunjukkan adanya tanin. Jika pada penambahan gelatin dan NaCl tidak timbul endapan, tetapi ditambahkan dengan larutan FeCl_3 menimbulkan warna hijau biru hingga hitam maka menunjukkan adanya senyawa polifenol.

b. Identifikasi dengan menggunakan KLT

Larutan 4A ditotolkan pada fase diam. Uji KLT ini menggunakan kondisi analisis fase diam berupa Keisel gel GF₂₅₄, fase gerak berupa kloroform: etil asetat (1:9) dan penampak noda berupa FeCl_3 . Jika terdapat noda hitam maka menunjukkan adanya senyawa polifenol pada ekstrak.

3.8 Uji Aktivitas Antibakteri

3.8.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dan bahan yang akan digunakan selama proses persiapan hingga pengujian aktivitas antibakteri disiapkan. Kemudian alat dan bahan dibungkus dengan kertas coklat untuk selanjutnya disterilisasi. Sterilisasi dilakukan dengan memasukkan bahan dan alat ke dalam autoklaf yang telah diatur pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Alat yang tidak tahan terhadap pemanasan uap dapat disterilisasi menggunakan oven, alkohol dan pemijaran.

3.8.2 Pembuatan Media

a. *Nutrien Agar* (NA)

Pembuatan media *Nutrien Agar* (NA) dilakukan untuk media peremajaan dan biakan bakteri. Sejumlah 1,15 gram NA dicampur dengan 50 mL aquades steril di dalam erlenmeyer. Kemudian media dipanaskan hingga mendidih dan larut. Setelah larut, sebanyak 5 mL media NA dituang pada tabung reaksi steril untuk media biakan bakteri. Lalu media NA disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media NA dalam tabung reaksi dimiringkan 30-45° agar terbentuk media agak miring. Kemudian media NA didinginkan dan dimasukkan ke dalam lemari es.

b. *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilakukan untuk membuat media uji. Sebanyak 1,9 gram MHA dicampur dengan 50 mL aquade steril di dalam erlenmeyer. Kemudian media MHA diaduk dan dipanaskan hingga mendidih dan larut. Setelah larut media MHA disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C. Selanjutnya media MHA dituang ke dalam cawan petri steril masing-masing 15 mL secara aseptis.

3.8.3 Pembuatan biakan murni

Bakteri uji *E. coli* yang diremajakan dengan menggosokkan bakteri menggunakan jarum ose pada media NA yang di dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.8.4 Peremajaan bakteri uji

Bakteri *E. coli* yang tumbuh dibiakkan dengan mengambil koloni bakteri menggunakan jarum ose pada media agar miring dalam kondisi aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3.8.5 Pembuatan suspensi Mc Farland 0,5

BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dicampur dengan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL hingga setara dengan 1,5x10⁸ CFU/mL. Selanjutnya divortex sampai campuran H₂SO₄ 1% dan BaCl₂ menjadi homogen. Setelah itu larutan Mc Farland diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 625 nm dalam rentang 0,08-0,1.

3.8.6 Suspensi *E.coli* (inokulum)

Pembuatan suspensi *E.coli* dilakukan dengan cara mengambil koloni *E. coli* pada media NA sebanyak 4-5 koloni dengan menggunakan jarum ose ke dalam 10 mL NaCl 0,9% yang kemudian divortex hingga homogen. Kekeruhan dari suspensi bakteri tersebut disesuaikan dengan kekeruhan bakteri 1,5x10⁸CFU/mL (suspensi McFarland 0,5). Semua proses pembuatan suspensi bakteri dilakukan secara aseptis.

3.8.7 Pembuatan kontrol negatif

Pembuatan kontrol negatif dilakukan dengan memipet 1 mL DMSO 100% yang kemudian dilarutkan ke dalam 10 mL aquades sehingga didapatkan konsentrasi DMSO 10%.

3.8.8 Penyiapan kontrol positif

Kontrol positif menggunakan cakram gentamisin 10 µg yang diperoleh dari Laboratorium Bagian Biologi.

3.8.9 Pembuatan larutan uji

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 100 mg, 200 mg, 300 mg, dan 400 mg yang kemudian masing-masing dilarutkan dengan 1 mL DMSO 10% sehingga didapatkan konsentrasi uji 10%, 20%, 30%, dan 40% b/v.

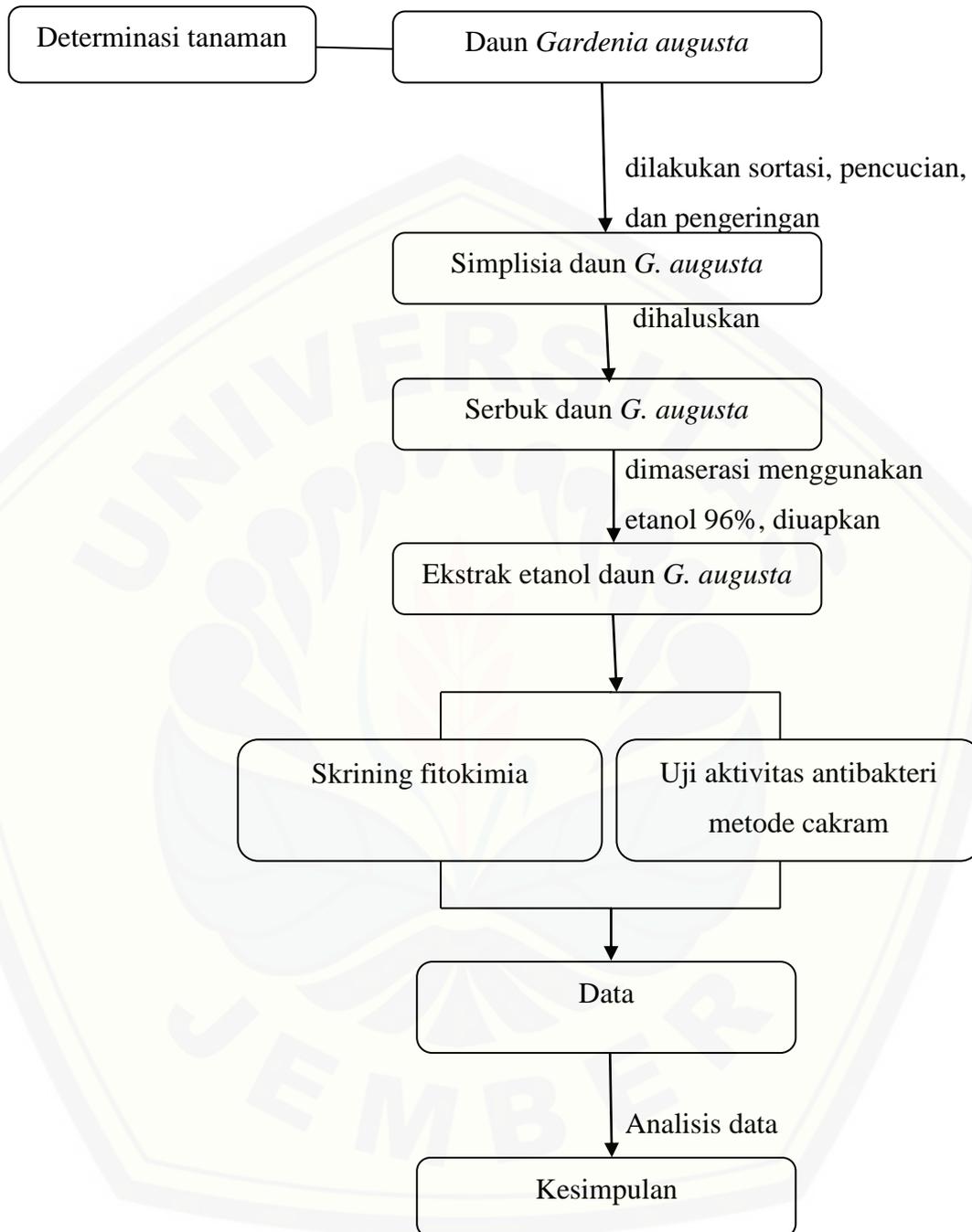
3.8.10 Penentuan aktivitas antibakteri

Kegiatan ini dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. yang dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Permukaan media MHA diinokulasi dengan mengambil inokulum bakteri dari suspensi bakteri yang telah disiapkan sebanyak 10 μ L. Kemudian suspensi yang telah diletakkan pada media MHA diratakan dengan menggunakan *spreader*. Selanjutnya letakkan kertas cakram yang telah terisi larutan uji pada media MHA. Kontrol positif dan kontrol negatif juga diletakkan pada media MHA. Setelah itu cawan petri dibungkus dengan *plastic wrap*, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menggunakan inkubator. Ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri akan berdifusi ke media agar dan menghambat pertumbuhan strain bakteri yang diuji. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 replikasi pada masing-masing konsentrasi uji.

3.3 Analisis Data

Data hasil diameter zona hambat yang diperoleh diuji homogenitas dan normalitas terlebih dahulu. Jika data yang dihasilkan homogen dan terdistribusi normal, maka dilanjutkan analisis menggunakan uji *One Way ANOVA*. Uji *One Way ANOVA* dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok, kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil uji *One Way ANOVA* dan LSD dikatakan signifikan jika $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Jika data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, data diuji statistik non parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan apabila diperoleh hasil yang signifikan maka dilanjutkan dengan *Man-Whitney* (Sudjana, 2000).

3.4 Skema Kerja



Gambar 3.2 Skema kerja penelitian

BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut;

1. Ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. positif mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, terpenoid, polifenol, steroid dan negatif mengandung tanin.
2. Ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *E. coli* pada konsentrasi 10, 20, 30, dan 40% b/v yang dibuktikan dengan zona hambat yang dihasilkan berturut-turut sebesar $6,43 \pm 0,02$, $7,35 \pm 0,05$, $8,42 \pm 0,03$, dan $9,45 \pm 0,04$ mm.
3. Berdasarkan uji *One Way* ANOVA dan LSD yang telah dilakukan, diperoleh $p=0,000$, hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada diameter zona hambat yang dihasilkan oleh konsentrasi 10, 20, 30, dan 40% b/v ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. terhadap *E. coli*.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, perlu dilakukan lebih lanjut mengenai;

1. Penelitian lebih lanjut dalam memisahkan senyawa aktif dalam ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. yang berpotensi sebagai aktivitas antibakteri.
2. Penetapan kadar total dari senyawa aktif dalam ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. yang berpotensi sebagai aktivitas antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Akinpelu, B. A., O. A. Igbeneghu, A. I. Awotunde, E. O. Iwalewa, dan O. O. Oyedapo. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of saponin fractions of *Erythropheleum suaveolens* (Guill. and Perri.) stem bark extract. *Scientific Research and Essays*. 9(18):826–833.
- Arabski, M., Wegierek-Ciuk, G. Czerwonka, A. Lankoff, dan W. Kaca. 2012. Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 1-6.
- Al-Gallas, N., Olfa Bahri, Aida Bouratbeen, Assia Ben Haasen, and R. B. A. 2007. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunisia, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(3):571–582.
- Barreto, M.L., M. G. T. dan E. H. C. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71–79.
- Chowdhury, A., S. Azam, M. A. Jainul, K. O. Faruq, dan A. Islam. 2014. antibacterial activities and in vitro anti-inflammatory (membrane stability) properties of methanolic extracts of *Gardenia coronaria* leaves. *International Journal of Microbiology*. 1–5.
- CLSI. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Edisi 27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. *CLSI Supplement M100*.
- Daciana Ciocan, I. I. B. 2007. Plant products as antimicrobial agents in Romania. *Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară*. 151–156.
- Dalimartha, S. 2003. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid-3*. Jakarta: Puspa Swara.
- Depkes, RI. 2000. *Parameter Standarisasi Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.

- Depkes RI. 2007. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 381/Menkes/Sk/iii/2007 Tentang Kebijakan Obat Tradisional Nasional. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Depkes RI. 2011. *Buku Saku Petugas Kesehatan Lintas Diare*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Depkes RI. 2014. *Farmakope Indonesia Edisi V*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Dipiro, C, Barbara G.Wells, Joseph T.Dipiro, T. L. S. 2009. *Pharmacotherapy Handbook Seventh Edition*. USA: Mc Graw Hill Medical.
- Doss, A., H. Mohammed Mubarack, dan R. Dhanabalan. 2009. Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian Journal of Science and Technology*. 2(2):41–43.
- Harborne, J. B.1984. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. New York: Chapman & Hall.
- Harborne, J. B. 2006. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi 3. Bandung: ITB Press.
- ITIS (Integrated Taxonomic Information). 2017. *Escherichia coli*. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=285#null [Diakses pada April 05, 2019].
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg's. 2007. *Medical Microbiology*. Edisi 24. USA: Mc Graw Hill Medical.
- Jawetz, Melnick, Adelberg's. 2013. *Medical Microbiology*. Edisi 26. USA: Mc Graw Hill Medical.
- Jussi-Pekka Rauha, Susanna Remes, Marina Heinonen, Kalevi Pihlaja, dan Heikki Vuorela. 2000. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 56:3.
- Katzung, B. G. 2004. *Basic and Clinical Pharmacology*. USA: Mc Graw Hill Medical.
- Tamilselvi, Anand S.p, D. A. 2017. Antimicrobial activity of *Gardenia latifolia* Ait. *International Journal of Current Advanced Research*. 7919–7922.

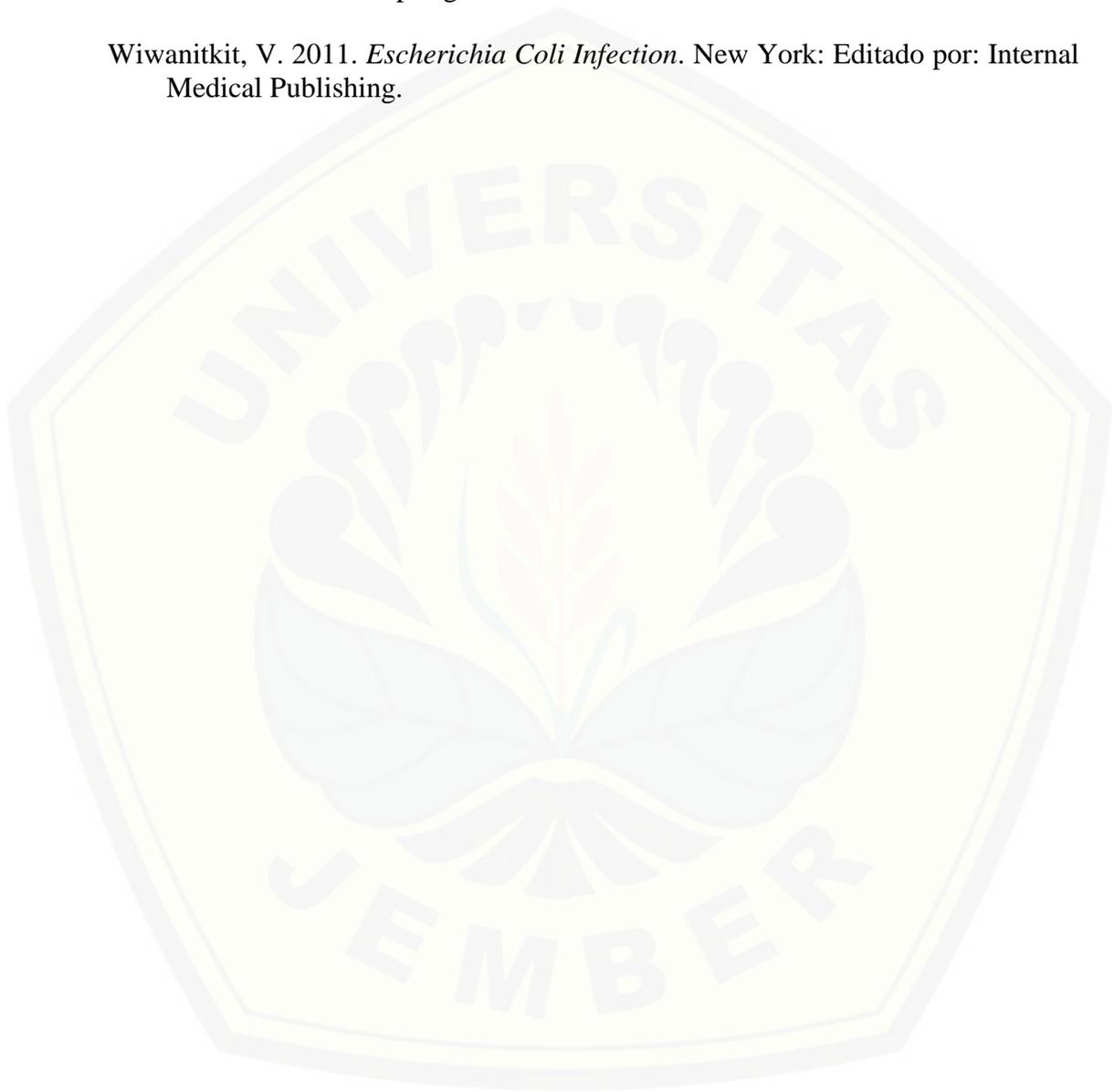
- Karou, D., M. H. Dicko, J. Simpore, dan A. S. Traore. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of Polyphenols from plant of *Burkina Faso*. *Africant Journal of Biotechnology*. 4(8):823-828.
- Karou, D., A. Savadogo, A. Canini, S. Yameogo, C. Montesano, J. Simpore, V. Colizzi, dan A. S. Traore. 2006. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*. 5(2):195-200.
- Koda-Kimble, M. 2009. *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*. Edisi 9. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kumar, S. dan A. K. Pandey. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids : an overview. *The ScientificWorld Journal*.
- Kumar, V., R. Mahmood, V. Krishna, dan B. Ravishankar. 2017. Evaluation of antibacterial activity from stem bark and leaf extracts of *Gardenia Gummifera* Linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(6):2026–2030.
- Manning, S. D. 2010. *Escherichia Coli Infection*. Edisi 2. USA: Mc Graw Hill Medical.
- Mariajancyrani, J., G. Chandramohan, A. Elayaraja, K. College, dan T. Nadu. 2013. Isolation and antibacterial activity of terpenoid from bougainvillea glabra choicy leaves. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 3(3):70–73.
- Minhatun Nafisah, Tukiran, Suyatno, N. H. 2014. Metanol dari tanaman patikan kebo (*Euphorbiae hirtae*). *Jurnal Universitas Surabaya*.
- Mujeeb, F., P. Bajpai, dan N. Pathak. 2014. Phytochemical evaluation, antimicrobial activity, and determination of bioactive components from leaves of *Aegle marmelos*. *BioMed Research International*. 1-11.
- Monem, Eman A. Mohamed, Elham T. Awad, Abdel-Hafiz M. Ramadan, H. A. M. 2014. Multiplex PCR as emerging technique for diagnosis of enterotoxigenic *E. coli* isolates from pediatric watery diarrhea. *Journal of American Science*. 10(10):157–164.
- Pfoze, N. L., Y. Kumar, B. Myrboh, R. K. Bhagobaty, dan S. R. Joshi. 2011. In vitro antibacterial activity of alkaloid extract from stem bark of *Mahonia manipurensis* takeda. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(5):859–861.
- Prashant Tiwari, Bimlesh Kumar, Mandeep Kaur, Gurpreet Kaur, H. K. 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. *International Pharmaceutica Scientia*. 1(1):98–106.

- Puspitasari, L.Swastini, D.A. dan Arisanti, C.I.A. 2013. Skrining fitokimia ekstrak etanol 95% kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Farmasi Udayana*.
- Putra, A. B. N. W. Bogoriani, N. P. Diantariani, dan N. L. U. S. 2014. Ekstraksi zat warna alam dari bonggol tanaman pisang (*Musa paradisiaca* L.) dengan metode maserasi, refluks, dan sokletasi. *Jurnal Kimia FMIPA Udayana*.
- Riskesdas. 2016. *Profil Kesehatan Indonesia 2015*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Riskesdas. 2017. *Data Dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2016*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Riskesdas. 2018. *Data Dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2017*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: Deepublish.
- Sudjana. 2000. *Metode Statistika*. Bandung: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Sukadana, I. M. 2010. Aktivitas antibakteri senyawa flavonoid dari kulit akar awar-awar (*Ficus septica* Burm F). *Jurnal Kimia FMIPA Udayana*. 63–70.
- Susanty, S. dan F. Bachmid. 2016. Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan refluks terhadap kadar fenolik dari ekstrak tongkol jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Konversi*. 5(2):87.
- Sweetman, S. . 2009. *Martindale: The Complete Drug Reference 36th Edition*. London: Pharmaceutical Press.
- Talaro, K. . 2009. *Foundation in Microbiology*. USA: Mc Graw Hill Medical.
- Uddin, R., M. R. Saha, N. Subhan, H. Hossain, I. A. Jahan, R. Akter, dan A. Alam. 2014. Hplc-analysis of polyphenolic compounds in *Gardenia jasminoides* and determination of antioxidant activity by using free radical scavenging assays. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 4(3):273–281.
- Ullah, I., A. Javaid, H. Masud, M. Ali, A. Basit, W. Ahmad, F. Younis, R. Yasmin, A. Khan, A. Jabbar, M. Husain, dan Z. A. Butt. 2017. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance in extrapulmonary tuberculosis and sputum smearnegative pulmonary suspects using xpert MTB/RIF. *Journal of Medical Microbiology*. 66(4):412–418.

Vaibhavi N. Garge, Kalpana V. Waikul, S. R. N. 2016. Antibacterial activity of *Gardenia gummifera* Linn. extracts. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS)*. 5(2):2277–7873.

Wagner, H. dan B. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. New York: Springer.

Wiwanitkit, V. 2011. *Escherichia Coli Infection*. New York: Editado por: Internal Medical Publishing.



LAMPIRAN

Lampiran A. Hasil Determinasi Tanaman *G. augusta* Merr.

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
LABORATORIUM TANAMAN
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 10/PL17.3.1.02/LL/2019

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Farmasi Universitas Jember No: 901/UN25.13/LL/2019 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Mohammad Thahir; I Wayan Seniarta; Siti Nur Azizah Hasyim
NIM : 152210101135; 152210101118; 152210101127
Jur/Fak/PT : Fakultas Farmasi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Asteridae; Ordo: Rubiales; Famili: Rubiaceae; Genus: Gardenia; Spesies: Gardenia augusta, Merr.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

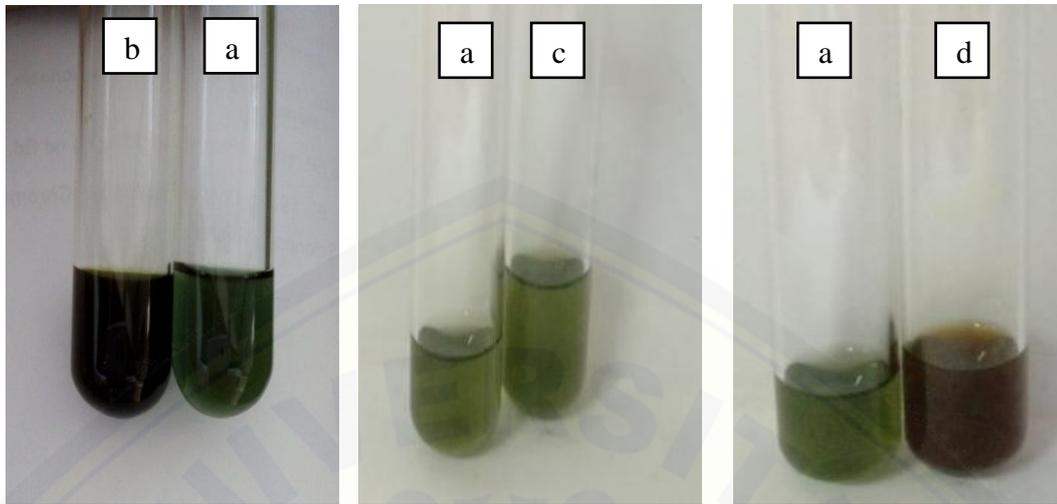


Jember, 11 April 2019
Kepala Laboratorium Tanaman

Dr. Lilik Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001

Lampiran B. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Daun *G. augusta* Merr.

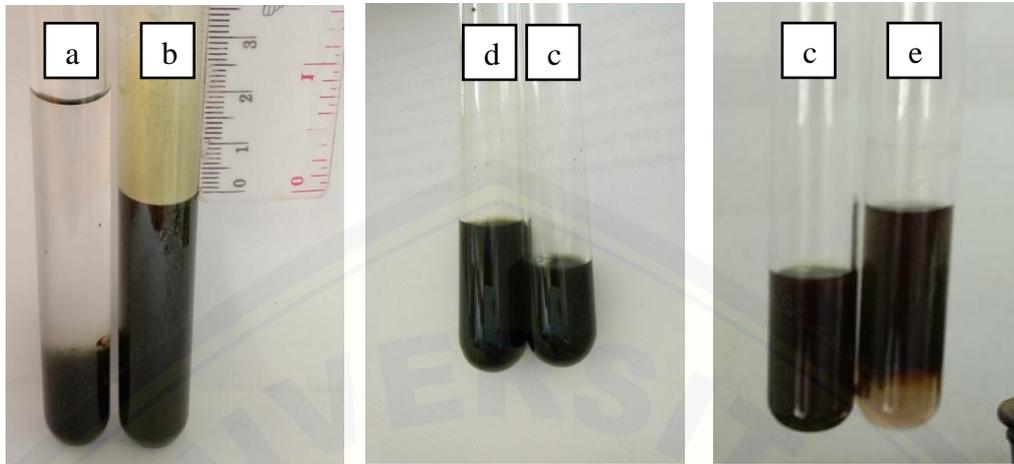
Berat serbuk kering <i>G. augusta</i> Merr	= 200,05 gram
Berat gelas	= 101,95 gram
Berat gelas+ berat ekstrak kental	= 142,47 gram
Berat ekstrak kental	= 40,52 gram
Perhitungan % Rendemen	= $\frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk kering}} \times 100\%$
	= $\frac{40,52 \text{ gram}}{200,05 \text{ gram}} \times 100\%$
	= 20,25%

Lampiran C. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun *G. augusta* Merr.

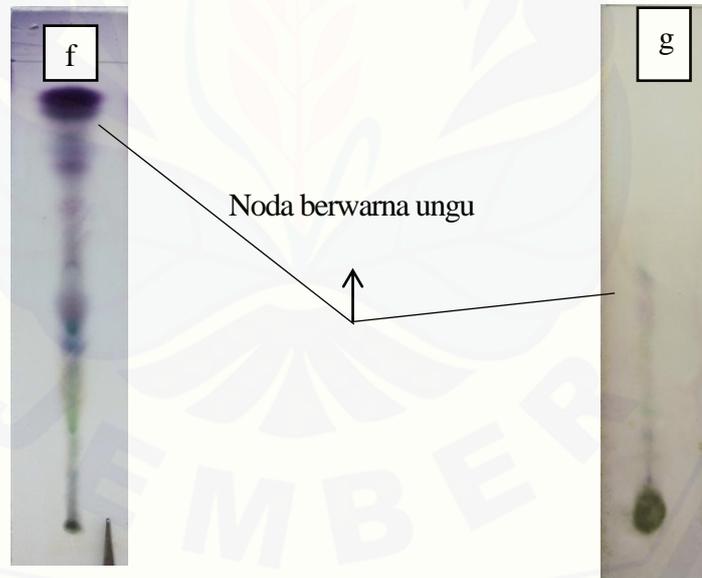
- Keterangan: (a) Blangko
(b) Penambahan pereaksi Dragendroff terdapat endapan merah jingga
(c) Penambahan pereaksi Mayer tidak terjadi perubahan warna
(d) Penambahan pereaksi Wagner terdapat endapan berwarna coklat



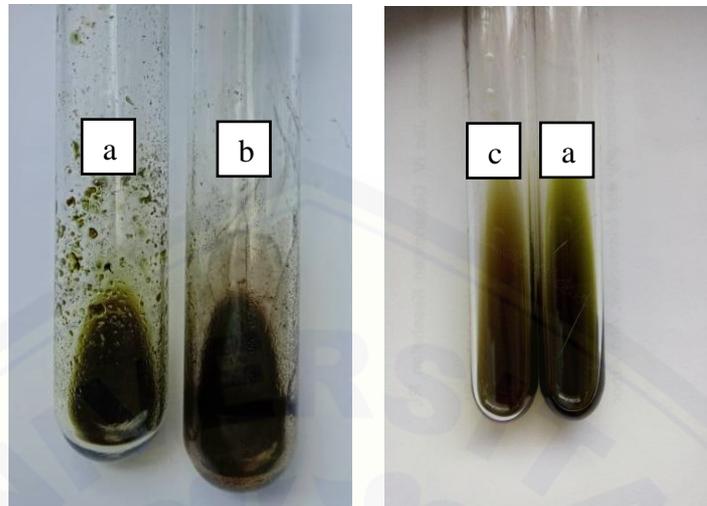
Gambar KLT Alkaloid dengan fase diam silica gel F₂₅₄, fase gerak etil asetat:metanol:air (9:2:2), dan penampak noda dragendroff



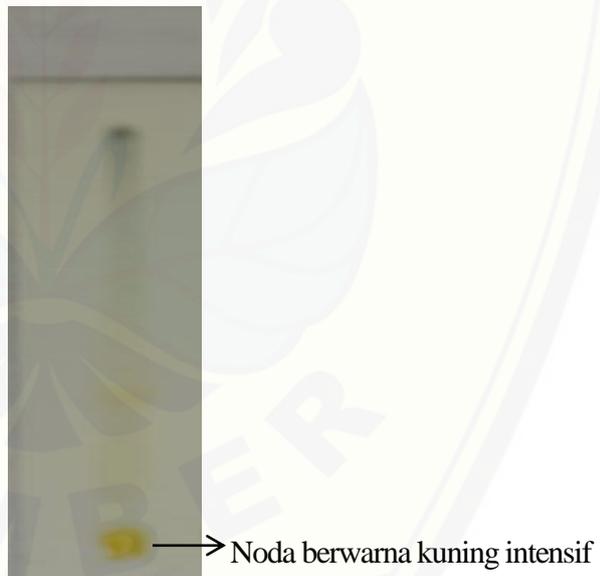
- Keterangan: (a) Uji buih sebelum dikocok kuat
 (b) Uji buih setelah dikocok kuat menghasilkan buih setinggi 3 cm
 (c) Blangko
 (d) Uji Libermann-Burchard terdapat perubahan warna menjadi hijau biru
 (e) Uji Salkowski terdapat cincin berwarna merah



Gambar KLT (f) Sapogenin Steroid atau Triterpenoid dan (g) KLT Terpenoid atau Steroid Bebas dengan fase diam silica gel F₂₅₄, fase gerak n-heksana:etil asetat (4:1), dan penampak noda anisaldehyd asam sulfat



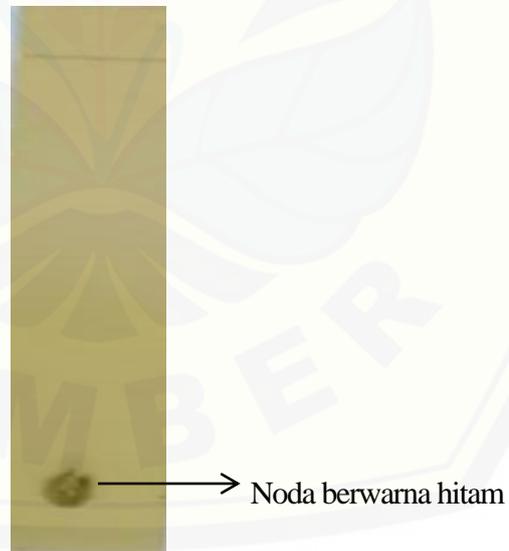
- Keterangan: (a) Blangko
(b) Uji Bate-Smith dan Metcalf terdapat perubahan warna ungu
(c) Uji Wilstater terdapat perubahan warna menjadi merah pucat



Gambar KLT Flavonoid dengan fase diam silica gel F₂₅₄, fase gerak butanol:asam asetat glasial:air (4:1:5), dan penampak noda uap ammonia



Keterangan: (a) Blangko
(b) Uji Gelatin tidak terdapat endapan berwarna putih
(c) Uji Ferriklorida terdapat perubahan warna menjadi warna hijau biru hingga hitam



Gambar KLT Polifenol dengan fase diam silica gel F₂₅₄, fase gerak kloroform:etil asetat (9:1), dan penampak noda FeCl₃

Lampiran D. Perhitungan Konsentrasi Uji ekstrak Etanol Daun *G. augusta* Merr.

- Konsentrasi 10% b/v

$$10\% \text{ b/v} = \frac{0,1006 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \times 100\%$$

Menimbang ekstrak sejumlah 0,1006 g kemudian dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10%, selanjutnya divortex hingga larut.

- Konsentrasi 20% b/v

$$20\% \text{ b/v} = \frac{0,2010 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \times 100\%$$

Menimbang ekstrak sejumlah 0,2010 g kemudian dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10%, selanjutnya divortex hingga larut.

- Konsentrasi 30% b/v

$$30\% \text{ b/v} = \frac{0,3005 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \times 100\%$$

Menimbang ekstrak sejumlah 0,3005 g kemudian dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10%, selanjutnya divortex hingga larut.

- Konsentrasi 40% b/v

$$40\% \text{ b/v} = \frac{0,4018 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \times 100\%$$

Menimbang ekstrak sejumlah 0,4018 g kemudian dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10%, selanjutnya divortex hingga larut.

Lampiran E. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri ekstrak Etanol Daun *G. augusta* Merr.

Tabel hasil pengamatan diameter zona hambat ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr. terhadap *E. coli*

Replikasi	Pengukuran diameter ke-	Diameter zona hambat (mm)					
		10%	20%	30%	40%	K+	K-
1	1	6,6	7,5	8,5	9,6	19,6	0,00
	2	6,3	7,4	8,2	9,4	19,1	0,00
	3	6,4	7,15	8,45	9,2	19,4	0,00
2	1	6,3	7,6	8,45	9,55	19,7	0,00
	2	6,45	7,4	8,5	9,3	19,4	0,00
	3	6,6	7,2	8,3	9,5	19,65	0,00
3	1	6,5	7,55	8,6	9,6	19,55	0,00
	2	6,45	7,45	8,6	9,45	19,6	0,00
	3	6,45	7,3	8,45	9,4	19,3	0,00

Tabel hasil pengamatan diameter zona hambat ekstrak etanol daun *G. augusta* Merr terhadap *E. coli* dan perhitungan SD, CV

Replikasi	Diameter zona hambat (mm)					
	10%	20%	30%	40%	K+	K-
1	6,43	7,35	8,38	9,40	19,37	0,00
2	6,45	7,40	8,40	9,45	19,40	0,00
3	6,47	7,45	8,43	9,48	19,46	0,00
Rata-rata	6,43	7,35	8,42	9,45	19,58	0,00
SD	0,02	0,05	0,03	0,04	0,05	0,00
CV	0,003	0,007	0,003	0,004	0,002	0,00

Lampiran F. Hasil Uji Statistik Ekstrak Etanol Daun *G. augusta* Merr.

Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Tests of Normality^b

	KONSENTRASI	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DAYA_	Konsentrasi 10%	,175	3	.	1,000	3	1,000
HAMB	Konsentrasi 20%	,175	3	.	1,000	3	1,000
AT	Konsentrasi 30%	,219	3	.	,987	3	,780
	Konsentrasi 40%	,232	3	.	,980	3	,726
	Kontrol Positif	,253	3	.	,964	3	,637

Jumlah kelompok uji <50, maka yang dilihat adalah hasil *Test of Normality* Shapiro-Wilk. Nilai kemaknaan yang diperoleh >0,05. Hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal.

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,626	5	12	,227

Significancy Test homogeneity menunjukkan angka 0,157 ($p > 0,05$) menunjukkan bahwa tidak ada varians antara kelompok uji yang dibandingkan dengan kata lain “variens data sama atau homogen”.

Hasil Uji One Way ANOVA dan LSD

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	592,764	5	118,553	97887,596	,000
Within Groups	,015	12	,001		
Total	592,778	17			

Nilai p yang diperoleh adalah 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan bermakna pada nilai zona hambat pada semua kelompok uji.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DAYA_HAMBAT

LSD

(I) KONSENTRASI	(J) KONSENTRASI	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Konsentrasi 10%	Konsentrasi 20%	-,95000*	,02841	,000	-1,0119	-,8881
	Konsentrasi 30%	-1,95333*	,02841	,000	-2,0152	-1,8914
	Konsentrasi 40%	-2,99333*	,02841	,000	-3,0552	-2,9314
	Kontrol Positif	-12,96000*	,02841	,000	-13,0219	-12,8981
	Kontrol Negatif	6,45000*	,02841	,000	6,3881	6,5119
Konsentrasi 20%	Konsentrasi 10%	,95000*	,02841	,000	,8881	1,0119
	Konsentrasi 30%	-1,00333*	,02841	,000	-1,0652	-,9414
	Konsentrasi 40%	-2,04333*	,02841	,000	-2,1052	-1,9814
	Kontrol Positif	-12,01000*	,02841	,000	-12,0719	-11,9481
	Kontrol Negatif	7,40000*	,02841	,000	7,3381	7,4619
Konsentrasi 30%	Konsentrasi 10%	1,95333*	,02841	,000	1,8914	2,0152
	Konsentrasi 20%	1,00333*	,02841	,000	,9414	1,0652
	Konsentrasi 40%	-1,04000*	,02841	,000	-1,1019	-,9781
	Kontrol Positif	-11,00667*	,02841	,000	-11,0686	-10,9448
	Kontrol Negatif	8,40333*	,02841	,000	8,3414	8,4652
Konsentrasi 40%	Konsentrasi 10%	2,99333*	,02841	,000	2,9314	3,0552
	Konsentrasi 20%	2,04333*	,02841	,000	1,9814	2,1052
	Konsentrasi 30%	1,04000*	,02841	,000	,9781	1,1019
	Kontrol Positif	-9,96667*	,02841	,000	-10,0286	-9,9048
	Kontrol Negatif	9,44333*	,02841	,000	9,3814	9,5052
Kontrol Positif	Konsentrasi 10%	12,96000*	,02841	,000	12,8981	13,0219
	Konsentrasi 20%	12,01000*	,02841	,000	11,9481	12,0719
	Konsentrasi 30%	11,00667*	,02841	,000	10,9448	11,0686
	Konsentrasi 40%	9,96667*	,02841	,000	9,9048	10,0286
	Kontrol Negatif	19,41000*	,02841	,000	19,3481	19,4719
Kontrol Negatif	Konsentrasi 10%	-6,45000*	,02841	,000	-6,5119	-6,3881
	Konsentrasi 20%	-7,40000*	,02841	,000	-7,4619	-7,3381
	Konsentrasi 30%	-8,40333*	,02841	,000	-8,4652	-8,3414
	Konsentrasi 40%	-9,44333*	,02841	,000	-9,5052	-9,3814
	Kontrol Positif	-19,41000*	,02841	,000	-19,4719	-19,3481

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Semua nilai p yang diperoleh 0,000 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna zona hambat pada semua kelompok konsentrasi uji.